

Low-viscosity polymer solution for capillary electrophoresis**Publication number:** DE69221969T**Publication date:** 1998-02-12**Inventor:** GROSSMAN PAUL DAVID (US)**Applicant:** PERKIN ELMER CORP (US)**Classification:****- International:** *C07K1/26; G01N27/447; C07K1/00; G01N27/447;*
(IPC1-7): G01N27/447**- European:** G01N27/447B5**Application number:** DE19926021969T 19920715**Priority number(s):** US19910731771 19910717**Also published as:**

EP0523982 (A)

US5126021 (A)

JP5215717 (A)

EP0523982 (B)

Report a data error he

Abstract not available for DE69221969T

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



⑲ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑫ **Übersetzung der
europäischen Patentschrift**

②⑦ **EP 0 523 982 B1**

⑩ **DE 692 21 969 T 2**

⑤ Int. Cl.⁸:
G 01 N 27/447

②①	Deutsches Aktenzeichen:	692 21 969.2
②⑥	Europäisches Aktenzeichen:	92 306 490.1
②⑧	Europäischer Anmeldetag:	15. 7. 92
②⑦	Erstveröffentlichung durch das EPA:	20. 1. 93
④⑥	Veröffentlichungstag der Patentansprüche in deutscher Übersetzung:	8. 7. 93
②⑦	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	3. 9. 97
④⑦	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	12. 2. 98

DE 692 21 969 T 2

③① Unionspriorität:

731771 17.07.91 US

⑦③ Patentinhaber:

Perkin-Elmer Corp., Foster City, Calif., US

⑦④ Vertreter:

Diehl, H., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., 80639 München;
Glaeser, J., Dipl.-Ing., 22767 Hamburg; Hiltl, E.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Burger, E., Dipl.-Ing.,
Pat.-Anwälte, 80639 München

⑧④ Benannte Vertragstaaten:

DE, FR, GB, IT

⑦② Erfinder:

Grossman, Paul David, Burlingame, CA 94010, US

⑤④ Polymerlösung mit niedriger Viskosität für die Kapillar-Elektrophorese

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II 5 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 692 21 969 T 2

21.08.97

0 523 982

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Kapillar-Elektrophorese, genauer auf eine Polymerlösung mit niedriger Viskosität und einer ausgewählten Porengröße zur elektrophoretischen Separation von Biopolymeren.

5

Folgende Dokumente bieten Hintergrundinformationen:

1. Olivera, B.M., Baine, P. und Davidson, N. (1964). Biopolymers, 2, 245.
- 10 2. Hermans, J.J. (1953). J. Polymer Sci., 18, 257.
3. Chin, A.M. und Colburn, J.C. (1989). Am. Biotech. Lab./News Edition, 7, 10A.
4. Zhu, M., Hansen, D.L., Burd, S. und Gannon, F. (1989). J. Chromatogr., 480, 311.
- 15 5. Bode, H.J. (1978). Anal. Biochem., 92, 99.
6. Langevin, D. und Rondelez, F. (1978). Polymer, 19, 875.
7. de Gennes, P.G. (1979). "Scaling Concepts in Polymer Physics." Cornell U.P., Ithica.
- 20 8. Ogston, A.G. (1958). Trans. Faraday Soc., 54, 1754.
9. Ferguson, K.A. (1964). Metabolism, 13, 985.
10. de Gennes, P.G. (1971). J. Chem. Phys., 55, 572.
11. Doi, M. und Edwards, S.F. (1978). JCS Faraday Transactions II, 79, 1789-1818.
- 25 12. Lerman, L.S. und Frisch, H.L. (1982). Biopolymers, 21, 995.
13. Lumpkin, O.J., Dejardin, P. und Zimm, B.H. (1985). Biopolymers, 24, 1573.
14. Hervet, H. und Bean, C.P. (1987). Biopolymers, 26, 727.
- 30 15. Schwartz, D.C., Saffran, W., Welsh, J., Haas, R., Goldenberg, M. und Cantor, C.R. (1982). Cold Spring Harbor Symp., 47, 189.

16. Jorgenson, J.N. und Lukacs, K.D. (1983). Science, 222, 266.
17. Lauer, H.H. und McManigill, D. (1986). Anal. Chem., 58, 166.
- 5 18. Grossman, P.D., Colburn, J.C. und Lauer, H.H. (1989). Anal. Biochem., 179, 28.
19. Rodrigues, F. (1982). "Principles of Polymer Systems." McGraw Hill, New York.
20. Hill, D.A. und Soane, D.S. (1989). J. Polym. Sci. Poly. Phys., B27, 2295.
- 10 21. Allcock, H.R. und Lampe, F.W. (1981). "Contemporary Polymer Chemistry." Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
22. Brandrup, J. und Immergut, E.H. (1989). "Polymer Handbook 3rd Edition." John Wiley & Sons, New York.
- 15 23. Flory, P.J. (1953). "Principles of Polymer Chemistry." Cornell U.P., Ithaca.
24. Righetti, P.G., Brost, B.C.W. und Snyder, R.S. (1981). J. Biochem. Biophys. Methods, 4, 347.
- 20 25. Cantor, C.R. und Schimmel, P.R. (1980). "Biophysical Chemistry." W.H. Freeman, New York.
26. Slater, G.W., Rousseau, J., Noolandi, J., Turmel, C. und Lalande, M. (1988). Biopolymers, 27, 509.
27. Slater, G.W. und Noolandi, J. (1989). Biopolymers, 28, 1781.
- 25

Es ist bekannt, daß für viele geladene Biopolymere von Interesse, z.B. einzel- und doppelsträngige DNA und mit Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturierte Proteine, auf

30 Unterschieden in der elektrophoretischen Mobilität in freier Lösung basierende Separationen nicht möglich sind [1, 2]. Daher muß man, um elektrophoretische Separationen von Mischungen aus diesen Molekülen zu bewirken, eine Gelmatrix verwenden, welche die Reibungs-

21.08.97

eigenschaften dieser Spezies so verändert, daß ihre elektrophoretische Mobilität von der Molekülgröße abhängig gemacht wird.

- 5 Bisher war die in Kapillarelektrophoresesystemen verwendete Gelmatrix im allgemeinen ein festes Gel, z.B. ein Agarosegel, oder eine quervernetzte Polymermatrix, z.B. eine quervernetzte Polyacrylamidmatrix. Solche Gele sind manchmal schwer ohne Blasen oder Lücken in
10 ein Kapillarröhrchen einzufüllen und schließen im allgemeinen eine Wiederverwendung des Röhrchens aus.

- Neuerdings wurden Kapillarelektrophoresesysteme beschrieben, in denen eine Polymerlösung als Separations-
15 medium verwendet wird. Die im Gemeinschaftsbesitz befindliche US-Patentanmeldung "Nucleic Acid Fractionation by Counter-Migration Capillary Electrophoresis", Ser.-Nr. 390,631, beschreibt ein Elektrophoresesystem, in dem die DNA-Fraktionierung in einer Polymerlösung,
20 die selbst durch das Röhrchen wandert, durch elektroosmotischen Fluß in einer der Richtung der DNA-Bewegung im Gel entgegengesetzten Richtung erfolgt. Die im Gemeinschaftsbesitz befindliche US-Patentanmeldung "High-Viscosity Polymer Matrix and Methods", Ser.-Nr.
25 472,045, beschreibt die Verwendung einer viskoelastischen Polymerlösung als Ersatzmatrix für eine quervernetzte Gelmatrix bei der Kapillar-Elektrophorese.

- Idealerweise sollte eine Polymerlösung zur Separation
30 einer Mischung aus Biopolymermolekülen (z.B. DNA-Fragmenten oder Polypeptiden) eine ausgewählte Porengröße besitzen, um die Separation der Biopolymermoleküle zu optimieren, und gleichzeitig eine minimale Viskosität aufweisen, damit die Lösung leicht in das Kapil-

larröhrchen gezogen und wieder daraus entfernt werden kann. Bisher war die Auswahl von Polymeren und Polymerkonzentrationen, die eine ausgewählte Porengröße und eine geringe Viskosität aufweisen, schwierig. Insbesondere wurden kleine Porengrößen, die für die Fraktionierung von Oligonucleotiden, z.B. bei der DNA-Sequenzierung, geeignet waren, allgemein nur bei hohen Polymerkonzentrationen erreicht, die auch zu hoher Lösungsviskosität führen. Am anderen Ende des Porengrößenspektrums, wo zur Erzielung großer Porengrößen große Polymere erforderlich sind, können sogar relativ dünnflüssige Polymerlösungen eine relativ hohe Viskosität aufweisen.

Die vorliegende Erfindung umfaßt unter einem Gesichtspunkt ein Kapillarelektrophorese-Element. Das Element umfaßt ein Elektrophoreseröhrchen, und in diesem eine Lösung aus einem ungeladenen, wasserlöslichen Polymer, gekennzeichnet durch:

- (a) eine Polymermassenkonzentration C , die zwischen ca. $1/[\eta]$ und $5/[\eta]$ liegt, wobei $[\eta]$ die intrinsische Viskosität des Polymers ist;
- (b) eine tatsächliche Lösungsviskosität von weniger als ca. 100 mPa·s; sowie
- (c) eine Polymer-Porengröße ξ , die ungefähr gleich $aC^{-0,75}$ ist, wobei a die Persistenzlänge des Polymers ist.

In einer Ausführung, in der die Polymerlösung eine Porengröße zwischen ca. 50 und 150 Å aufweist, liegt die Massenkonzentration des Polymers zwischen ca. 3 und 6

21.08.97

Gew.-%, und die Polymerlösung weist eine Viskosität zwischen ca. 5 und 50 mPa·s auf. In einer anderen Ausführung, in der die Porengröße zwischen ca. 200 und 300 Å liegt, beträgt die Massenkonzentration des Polymer-
5 mers zwischen ca. 0,2 und 0,6 Gew.-%, und die Polymerlösung hat eine Viskosität zwischen ca. 1 und 10 mPa·s.

Unter einem anderen Gesichtspunkt umfaßt die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines bei der elektrophoretischen Separation durch Kapillar-Elektrophorese ei-
10 ner Mischung von Biopolymermolekülen innerhalb eines ausgewählten Größenbereichs zu verwendenden Polymerelements. Das Verfahren umfaßt die Schritte Auswählen einer Polymerporengröße, die zur Separation der Biopolymermischung in einem elektrischen Feld geeignet ist,
15 und anschließend Auswählen eines ungeladenen, wasserlöslichen Polymers mit einer intrinsischen Viskosität $[\eta]$ und einer Persistenzlänge a , so daß die ausgewählte Porengröße ungefähr gleich $aC^{-0,75}$ ist, wobei C zwischen
20 ca. $1/[\eta]$ und $5/[\eta]$ liegt. Es wird eine Lösung aus dem Polymer mit einer Konzentration C zwischen ca. $1/[\eta]$ und $5/[\eta]$ gebildet, und diese Lösung wird in ein Kapillarelektrophoreseröhrchen gezogen.

25 Dieses und andere Merkmale der Erfindung werden deutlicher, wenn die folgende detaillierte Beschreibung der Erfindung in Verbindung mit den zugehörigen Abbildungen gelesen wird, in denen:

30 Fig. 1 eine schematische Darstellung des Verwicklungsprozesses ist, wobei für 1A $\phi < \phi^*$, für 1B $\phi \approx \phi^*$ und für 1C $\phi > \phi^*$ ist;

Fig. 2 eine schematische Illustration der verwickelten Poren ist, wobei ξ die Porengröße angibt;

5 Fig. 3 eine schematische Abbildung eines aufgelösten Stoffes ist, der nach dem Ogston-Mechanismus durch ein Polymernetz wandert, worin der aufgelöste Stoff durch die Poren sickert, als ob er ein starres Teilchen wäre;

10 Fig. 4 eine schematische Abbildung eines aufgelösten Stoffes ist, der nach dem Reptationsmechanismus wandert, worin die Spule aus aufgelöstem Stoff "mit dem Kopf voran" durch die "Röhren" gepreßt wird, die vom Polymernetz gebildet werden;

15 Fig. 5 eine schematische Illustration ist, die den verlängernden Einfluß des elektrischen Felds auf die Größe eines Moleküls veranschaulicht, das nach dem Reptationsmechanismus wandert. Wenn $E = 0$ ist, sind $R_g \sim N^{0.5}$ und $\mu \sim \frac{1}{N}$, wenn E hingegen groß ist, ist $R_g \sim N^{1.0}$ und μ ist unabhängig von N ;

20

Fig. 6 die Abhängigkeit der spezifischen Viskosität, η_{sp} , einer HEC-Pufferlösung von der HEC-Konzentration zeigt;

25

Fig. 7 Kurven darstellt, welche die Porengröße, ξ , zeigen, die für verwickelte HEC-Lösungen (A) und Agarosegele (B) als Funktion der porenbildenden Polymervolumenfraktion, ϕ , vorausgesagt wird;

30

Fig. 8 ein repräsentatives Elektropherogramm ist, das die Separation von 11 DNA-Restriktionsfragmenten dar-

21.05.97

stellt, deren Größe zwischen 72 und 1353 Basenpaaren liegt, wie in der Figur dargestellt;

Fig. 9 ein Ferguson-Plot für Proben-DNA-Fragmente ist, deren Basenpaargröße zwischen 118 und 1353 liegt;

Fig. 10 die Quadratwurzel des Verzögerungskoeffizienten K_r gegenüber dem quadratischen Mittelwert des Trägheitsradius $\langle R_g^2 \rangle^{1/2}$ der DNA-Fragmente aus Fig. 9 zeigt; und

Fig. 11 eine Grafik des Logarithmus der elektrophoretischen Mobilität gegenüber dem Logarithmus der inversen Molekulargröße (in Basenpaaren) für unterschiedliche HEC-Konzentrationen ist.

I. Polymerporengröße und Viskositätsbetrachtungen

A. Polymerporengröße

In diesem Abschnitt werden der Begriff einer verwickelten Polymerlösung und einige der Skalierungsgesetze, die zur Beschreibung ihrer Eigenschaften entwickelt wurden, vorgestellt.

Überlappungsschwelle: Ein wichtiger Unterschied besteht zwischen dünnflüssigen Polymerlösungen, bei denen die Polymerketten hydrodynamisch voneinander isoliert sind, und konzentrierteren Lösungen, bei denen sich die Ketten überlappen und interagieren. Die Polymervolumenfraktion, bei der die Polymerketten beginnen, zu interagieren, ϕ^* , wird Überlappungsschwelle genannt. Über dieser Konzentration nennt man die Lösung verwickelt.

Eine schematische Illustration des Verwicklungsprozesses ist in Fig. 1 dargestellt.

Ein Ausdruck, der den Wert von ϕ^* als Funktion der Polymergröße voraussagt, wurde zuerst von de Gennes [7] abgeleitet. Dieser Ausdruck basiert auf der Annahme, daß, wenn $\phi \approx \phi^*$ ist, die Massenkonzentration der Lösung dieselbe ist wie die Konzentration in einer einzelnen Spule. Für Polymere in einem athermischen Lösungsmittel führt diese Annahme zu dem Ausdruck:

$$\phi^* \approx N^{-0.8} \quad (1)$$

Wenn N groß ist, kann ϕ^* also sehr klein sein. Wenn beispielsweise $N = 10^4$, liegt ϕ^* im Bereich von 10^{-3} . Dadurch können sich auch scheinbar dünnflüssige Polymerlösungen in einem verwickelten Zustand befinden.

Eine verwickelte Lösung ist durch eine durchschnittliche Porengröße, ξ , gekennzeichnet (Fig. 2). De Gennes [7] hat einen approximativen Ausdruck abgeleitet, der ξ zur Polymervolumenfraktion, ϕ , in Beziehung setzt. Für $\phi > \phi^*$ hängt ξ nur von der Volumenfraktion des Polymers, ϕ , und nicht von der Größe der Polymerkette, N , ab. Dadurch wird ganz einfach festgestellt, daß die Porengröße kleiner ist als die Gesamtlänge des Polymers. Als nächstes wird angenommen, daß, wenn $\phi \approx \phi^*$ ist, die Porengröße mit der Größe einer einzelnen Spule, R_g , vergleichbar ist. Diese beiden Annahmen führen zu dem Ausdruck:

$$\xi(\phi) \approx a \phi^{-0.75} \quad (2)$$

Wieder wird in Gleichung (2) angenommen, daß das Polymer in einem athermischen Lösungsmittel aufgelöst wird. Dies ist ein wichtiges Ergebnis, das die Größe der Pore in einer verwickelten Lösung an der Volumenfraktion des
5 Polymers festmacht.

B. Optimale Polymergröße

Um verwickelte Polymerlösungen auf den größten Bereich
10 von Biopolymerseparationen anzuwenden, möchte man die Porengröße in der Lösung variieren können. Gemäß Gleichung (2) muß man jedoch eine hohe Polymerkonzentration verwenden, wenn man in einem bestimmten Polymer eine kleine Pore bilden möchte. Wenn jedoch die Polymerkonzentration erhöht wird, steigt auch die Lösungsviskosität an. Idealerweise möchte man die praktischen Vorteile einer niedrigen Viskosität aufrechterhalten, wenn man zu einer kleineren Pore übergeht. Die oben genannten Beziehungen zeigen an, wie dieses erreicht werden
15 könnte. Um die Viskosität der Polymerlösung zu minimieren, möchte man nahe bei ϕ^* operieren. Gleichung (2) sagt jedoch voraus, daß man einen großen Wert für ϕ braucht, um eine kleine Pore zu erzielen. Um beide Anforderungen zu erfüllen, sollte man ein kürzeres Polymer verwenden, um eine engere Pore zu bilden. Dies kann
20 durch die Kombination der Gleichungen (1) und (2) demonstriert werden, wodurch sich folgender Ausdruck ergibt:

$$\xi(\phi^*) \approx a N^{0,6} \quad (3)$$

30

Um also eine größere Pore zu erzeugen und gleichzeitig die Viskosität der Lösung zu minimieren, muß man ein längeres Polymer verwenden, und um eine kleinere Pore zu erzeugen, muß man ein kürzeres Polymer verwenden.

C. Elektrophoretische Wanderung

Sobald die Netzstruktur der Polymerlösung festgelegt wurde, können wir die Auswirkungen des Polymerlösungsnetzes auf die Elektrophorese ansprechen. Wie im Fall der traditionellen Gelelektrophorese gibt es zwei Haupttheorien, welche die Wanderung eines flexiblen Makromoleküls durch ein Polymernetz beschreiben: das Ogston-Siebmodell und das Reptationsmodell. Die Anwendbarkeit der Modelle hängt jeweils von der Größe des wandernden Moleküls relativ zur Porengröße des Netzes ab.

Das Ogston-Modell: Das Ogston-Modell behandelt das Polymernetz als Molekularsieb. Es geht davon aus, daß die Matrix aus einem zufälligen Netz miteinander verbundener Poren mit einer durchschnittlichen Porengröße, ξ , besteht und daß sich der wandernde aufgelöste Stoff wie ein undeformierbares Teilchen mit dem Radius R_g verhält. Nach diesem Modell wandern kleinere Moleküle schneller, da sie auf eine größere Fraktion der verfügbaren Poren Zugriff haben. Die mathematische Behandlung dieses Problems wurde zuerst von Ogston [8] vorgestellt. Fig. 3 ist eine schematische Illustration, die einen aufgelösten Stoff zeigt, der nach dem Ogston-Mechanismus durch ein Polymernetz wandert.

Nach der Ogston-Theorie wird angenommen, daß die elektrophoretische Mobilität des wandernden aufgelösten Stoffs durch die poröse Struktur genauso groß ist wie seine freie Lösungsmobilität, μ_0 , multipliziert mit der Wahrscheinlichkeit, daß der aufgelöste Stoff auf eine Pore trifft, die groß genug ist, um ihn durchzulassen. Daher gilt:

21.08.97

$$\mu = \mu_0 P (\xi \geq R_g) \quad (4)$$

wobei ξ der Radius der Pore ist, in der sich die Spule befindet, und $P (\xi \geq R_g)$ die Wahrscheinlichkeit ist, daß eine bestimmte Pore einen Radius hat, der größer als oder gleich groß wie der Radius des wandernden Teilchens ist. Das Ogston-Modell der Porengrößenverteilung sagt voraus, daß in einem zufälligen Netz linearer Polymere die Fraktion von Poren, die groß genug sind, um ein kugelförmiges Teilchen mit dem Radius R_g aufzunehmen,

$$P (\xi \geq R_g) = \exp(-\pi n l (r + R_g)^2) \quad (5)$$

ist, wobei n die Durchschnittszahl von Polymersträngen pro Volumeneinheit, l die Durchschnittslänge der Polymerstränge und r die Dicke der Stränge ist. Außerdem geht dieses Modell davon aus, daß das Produkt $n \cdot l$ proportional zur Konzentration, C , des gelbildenden Polymers ist. Daher gilt:

$$P (\xi \geq R_g) = \exp(-KC(r + R_g)^2) \quad (6)$$

wobei K eine Proportionalitätskonstante ist. In Gleichung (6) ist der Ausdruck $K(r + R_g)^2$ als Verzögerungskoeffizient, K_r , bekannt und ist ein Kennzeichen einer bestimmten molekularen Spezies in einem besonderen Polymersystem.

Durch Kombination der Gleichungen (4) und (6) ergibt sich der Endausdruck, der die Wanderung eines aufgelösten Stoffes durch ein Polymernetz nach dem Ogston-Mechanismus beschreibt:

$$\mu = \mu_0 \exp(-KC(r + R_g)^2) \quad (7)$$

Wenn $r \ll R_g$ ist, würde man erwarten, daß sich beim Auftragen von $\log(\mu/\mu_0)$ gegen C eine gerade Linie mit einer zu R_g^2 proportionalen Steigung ergibt. Solche Grafiken sind als Ferguson-Plots [9] bekannt.

Wie oben erwähnt, geht das Ogston-Modell davon aus, daß sich der wandernde aufgelöste Stoff wie ein undeformierbares kugelförmiges Teilchen verhält. Es berücksichtigt nicht die Tatsache, daß sich das wandernde Molekül deformieren könnte, um sich durch eine Pore zu "pressen". Daher sagt das Ogston-Modell voraus, daß die elektrophoretische Mobilität des wandernden aufgelösten Stoffes schnell gegen Null geht, wenn $R_g > \xi$ ist. Es ist jedoch bekannt, daß große flexible Kettenmoleküle wie die DNA sogar weiter wandern, wenn $R_g \gg \xi$ ist. Dies wird durch das zweite Modell für die Wanderung, das Reptationsmodell, erklärt. Das Reptationsmodell geht davon aus, daß sich das wandernde Molekül "mit dem Kopf voran" durch das poröse Netz bewegt anstatt als undeformierbares Teilchen mit dem Radius R_g zu wandern. Das Reptationsmodell ist Gegenstand des folgenden Abschnitts.

Reptation und abgelenkte Reptation: Die Basis des Reptationsmodells ist die Erkenntnis, daß sich ein langes flexibles Molekül bei der Wanderung durch ein Polymernetz mit einer kleineren Porengröße als R_g nicht notwendigerweise als undeformiertes Teilchen bewegt, sondern sich stattdessen "mit dem Kopf voran" durch das Polymernetz "schlängelt". Es wird angenommen, daß der wandernde aufgelöste Stoff auf "Röhren" beschränkt ist,

die von der Gelmatrix gebildet werden. Der Begriff Reptation kommt von der reptilienartigen Natur dieser Bewegung. Fig. 4 zeigt eine schematische Illustration eines flexiblen Makromoleküls bei der Reptation. Die erste Beschreibung des Reptationsmechanismus wurde von de Gennes [7, 10] sowie Doi und Edwards [11] vorgestellt, während die erste Anwendung der Reptationstheorie auf die Elektrophorese von Biopolymeren von Lerman und Frisch [12] vorgestellt wurde. Nach diesen Modellen gilt, wenn ein flexibler aufgelöster Stoff nach dem Reptationsmechanismus wandert, innerhalb der Grenze der elektrischen Feldstärke Null:

$$\mu \sim \frac{N_2}{N} = \frac{1}{N} \quad (8)$$

Gleichung (8) gibt an, daß für ein kettenähnliches Molekül, das unter dem Einfluß eines elektrischen Felds eine Reptilbewegung ausführt, die elektrophoretische Mobilität umgekehrt proportional zur Moleküllänge ist.

Eine Verfeinerung des Reptationsmodells, die den Einfluß großer elektrischer Feldstärken berücksichtigt, ist das Modell der abgelenkten Reptation. Wenn das elektrische Feld groß wird, ist die Annahme, daß das wandernde Molekül als unbeeinflusste Spule existiert, nicht länger gültig. Aufgrund der induzierten Ausrichtung des größeren Segments während der Erhöhung der Feldstärke wird die Spule längergezogen. Dies ist schematisch in Fig. 5 dargestellt. Im Extremfall wird die Spule zum Stab. Wenn das wandernde Molekül zu einem Stab wird, wird die elektrophoretische Mobilität wieder unabhängig von der Molekülgröße. Während also die Spule längergezogen wird, verschwindet die Abhängigkeit der

Größe $\frac{1}{N}$ von μ . Diese Wirkung wurde zuerst von Lumpkin [13] beschrieben, der zu einem Ausdruck der Form

$$\mu \approx K\left(\frac{1}{N} + bE^2\right) \quad (9)$$

5 kam, wobei K eine Konstante und b eine Funktion der Porengröße des Polymernetzes sowie der Ladung und Persistenzlänge des wandernden aufgelösten Stoffs ist. Der erste Ausdruck in Gleichung (9) hängt von der Größe des wandernden Moleküls ab, jedoch nicht von der elektrischen Feldstärke, während der zweite Ausdruck nicht von der Molekülgröße, jedoch von der elektrischen Feldstärke abhängt. Daher sinkt die Abhängigkeit der Mobilität von der Molekülgröße, wenn das elektrische Feld oder die Molekülgröße ansteigen. Dies ist die Schlüsselvoraus-
 10 aussage des Modells der abgelenkten Reptation. Das vorausgesagte Verhalten wurde experimentell beobachtet [14]. Aufgrund dieser Wirkung beträgt die maximale DNA-Größe, die mit traditionellen elektrophoretischen Techniken separiert werden kann, ca. 20.000 Basenpaare. Um
 15 diese Grenze zu überschreiten, müssen pulsierende Felder eingesetzt werden.
 20

II. Polymerauswahlverfahren

25 Unter einem Gesichtspunkt der Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung eines Polymerelements vorgesehen, das bei der elektrophoretischen Separation einer Mischung aus Biopolymermolekülen innerhalb eines ausgewählten Größenbereichs durch Kapillar-Elektrophorese
 30 verwendet werden kann. Zuerst wählt man bei dem Verfahren eine Polymer-Porengröße ξ , die zur Separation der Biopolymermischung in einem elektrischen Feld geeignet ist. Zur Separation einzelsträngiger Oligonucleotide

ist beispielsweise eine Porengröße von ca. 50-150 Å geeignet. Zur Separation relativ großer doppelsträngiger DNA, z.B. im Größenbereich bis zu 10.000 Basenpaaren, ist eine Porengröße von 200-300 Å geeignet.

5

Dann wird ein ungeladenes, wasserlösliches Polymer mit einer intrinsischen Viskosität $[\eta]$ und einer Persistenzlänge a ausgewählt, so daß die ausgewählte Porengröße ungefähr gleich $aC^{-0,75}$ ist, wobei C zwischen ca. $1/[\eta]$ und $5/[\eta]$ liegt und die tatsächliche Viskosität weniger als ca. 100 mPa·s beträgt.

10

Zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung bevorzugte Polymere sind lineare Polyoxide, Polyether, z.B. Polyethylenoxid (Polyethylenglycol), sowie Polypropylenoxid, Polyethylenimin, Polyacrylsäure, Polyacrylamid, Polymethacrylamid, Polymethacrylsäure, Polyvinylacetat, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylloxazolidon sowie verschiedene wasserlösliche Hydroxylpolymere, z.B. natürliche Gummis (Xanthan, Dextran, Guar, usw.), wasserlösliche Celluloseverbindungen, z.B. Methylcellulose und Hydroxyethylcellulose sowie Copolymere und Mischungen aus diesen Polymeren.

15

20

25

Geeignete wasserlösliche Polymere mit einem breiten Bereich an Molekulargewichten (oft als Lösungsviskosität bei einer bestimmten Polymerkonzentration ausgedrückt) sind im Handel erhältlich oder können unter definierten Polymerbildungsbedingungen hergestellt werden, wie in den nachfolgenden Beispielen veranschaulicht.

30

Die intrinsische Viskosität eines Polymers kann folgendermaßen experimentell bestimmt werden: Die spezifische Viskosität η_{sp} einer Lösung wird zuerst bei einer ausgewählten Temperatur (der erwarteten Lauftemperatur der Elektrophorese) aus der tatsächlichen Viskosität η_a der Lösung und der Viskosität des Lösungsmittels η_0 , aus dem Ausdruck $\eta_{sp} = \eta_a/\eta_0 - 1$ gemessen. Wenn die ausdruckspezifische Konzentration Viskosität/Polymer (η_{sp}/C) gegen die Polymerkonzentration aufgetragen wird, ergibt der Schnittpunkt mit der Y-Achse (Polymerkonzentration Null) die intrinsische Viskosität $[\eta]$ auf der Achse η_{sp}/C .

Wie oben besprochen, tritt die Verwicklungskonzentration eines ausgewählten Polymers bei einer Konzentration C° auf, bei der $C^\circ[\eta] = 1$, d.h. bei der $C = 1/[\eta]$. Eine Polymerkonzentration zwischen ca. $1/[\eta]$ und $5/[\eta]$ erstreckt sich also von der Verwicklungskonzentration C° bis zu einer Konzentration von $5C^\circ$. Vorzugsweise liegt die Polymerkonzentration zwischen C° und $2C^\circ$.

Die Persistenzlänge a eines Polymers kann aus der intrinsischen Viskosität $[\eta]$, dem Molekulargewicht (MW), der Konstanten ϕ_c sowie $\langle r^2 \rangle$ nach den untenstehenden Gleichungen 11 und 12 bestimmt werden. Sobald der Wert von a bekannt ist, kann die Porengröße des Polymers mit der obenstehenden Gleichung (2) bestimmt werden.

Der untere Bereich der Polymerkonzentration (C°) ist daher nur erforderlich, um die erforderliche Verwicklung im Polymer zu erzeugen. Der obere Polymerbereich (z.B. $2-5C^\circ$) verringert nach Gleichung (2) die Poren-

größe, gewährleistet aber immer noch eine niedrige Viskosität der Polymerlösung, vorzugsweise unter ca. 100 mPa·s, noch besser bei ca. 1-50 mPa·s.

- 5 Zur Illustration: Um eine Lösung mit niedriger Viskosität und einer Porengröße von ca. 50-150 Å herzustellen, wird ein Hydroxyethylcellulose(HEC)-Polymer (das einen Wert für a von ca. 4,25 Å hat) mit einem Molekulargewicht von ca. 24 Kilodalton ($N = \text{ca. } 128$) in einem wäßrigen Puffer auf eine Endkonzentration des Polymers zwischen ca. 3 und 6 Gew.-% abgestimmt. Die Viskosität der Lösung liegt zwischen ca. 5 und 50 mPa·s. Diese Lösung für die elektrophoretische Separation einzelsträngiger Oligonucleotide geeignet.

- 15 Ähnlich wird zur Herstellung einer Polymerlösung mit einer Porengröße von ca. 200-300 Å ein Hydroxyethylcellulose(HEC)-Polymer mit einem Molekulargewicht von ca. 191 Kilodalton ($N = \text{ca. } 1026$) in einem wäßrigen Puffer auf eine Endkonzentration des Polymers zwischen ca. 0,2 und 0,6 Gew.-% abgestimmt. Die Viskosität der Lösung liegt zwischen ca. 1 und 10 mPa·s. Diese Lösung ist für die elektrophoretische Separation doppelsträngiger DNA-Fragmente mit Molekulargewichten von bis zu ca. 10.000 Basenpaaren geeignet.

- Nach der Herstellung der Polymerlösung mit der ausgewählten Porengröße und der gewünschten niedrigen Viskosität wird die Lösung in ein zur elektrophoretischen Separation von Biopolymeren verwendetes Kapillarröhrchen gezogen. Die elektrophoretische Separation kann nach Standard-Kapillarelektrophoreseverfahren durchgeführt werden.

III. Kapillarelektrophorese-Element

Unter einem anderen Gesichtspunkt umfaßt die Erfindung ein Kapillarelektrophorese-Element. Das Element wird
5 wie in Abschnitt II beschrieben hergestellt und umfaßt ein Kapillarelektrophoreseröhrchen, und in dem Röhrchen eine Lösung aus einem ungeladenen, wasserlöslichen Polymer, gekennzeichnet durch:

10 (a) eine Polymermassenkonzentration C , die zwischen ca. $1/[\eta]$ und $5/[\eta]$ liegt, wobei η die intrinsische Viskosität des Polymers ist;

15 (b) eine tatsächliche Lösungsviskosität von unter ca. 100 mPa·s; sowie

(c) eine Polymer-Porengröße ξ , die ungefähr gleich $aC^{-0,75}$ ist, wobei a die Persistenzlänge des Polymers ist.

20 In einer exemplarischen Ausführung, die wie oben hergestellt wird, liegt die Porengröße zwischen ca. 50 und 100 Å und die Massenkonzentration des Polymers zwischen ca. 3 und 6 Gew.-%, und die Polymerlösung hat eine Viskosität zwischen ca. 5 und 50 mPa·s. In einer anderen
25 exemplarischen Ausführung, die ebenfalls wie in Abschnitt II beschrieben hergestellt wird, liegt die Porengröße zwischen 200 und 300 Å und die Massenkonzentration des Polymers zwischen ca. 0,2 und 0,6 Gew.-%, und die Polymerlösung hat eine Viskosität zwischen ca.
30 1 und 10 mPa·s.

Die folgenden Verfahren und Beispiele veranschaulichen verschiedene Herstellungen und Verfahren, die bei der

Anwendung der vorliegenden Erfindung verwendet wurden. Die Beispiele dienen nur der Veranschaulichung und sollen den Geltungsbereich der Erfindung nicht begrenzen.

5

Beispiel 1Experimentelle Verfahren

A. Kapillarelektrophoresesystem

- 10 Das bei dieser Arbeit verwendete Kapillarelektrophoresesystem ist dem an anderer Stelle beschriebenen [16, 17] sehr ähnlich. Ein gerades Stück einer mit Polyamid beschichteten Kapillare aus Hartfeuerporzellan (Poly-
- 15 micro Technologies Inc., Phoenix, AZ), 50 cm lang (Abstand zum Detektor 35 cm) mit einem Innendurchmesser von 50 μm und einem Außendurchmesser von 375 μm , verbindet den anodischen Behälter mit dem elektrisch geerdeten kathodischen Behälter. Eine Hochspannungsquelle, die bis zu 30.000 V erzeugen kann (Gammar High Voltage
- 20 Research, Inc., Ormand Beach, FL), wurde verwendet, um den Elektrophoreseprozeß anzutreiben. Der Strom durch die Kapillare wurde mit einem digitalen Multimeter (Hewlett-Packard, Modell 3465B, Palo Alto, CA) über einen 1 $\text{k}\Omega$ -Widerstand in der Rückleitung der Stromquelle
- 25 gemessen.

- Die UV-Messung auf der Säule bei 260 nm wurde mit einem modifizierten variablen Wellenlängendetektor (Applied BioSystems, Modell 783, Foster City, CA) durchgeführt.
- 30 Das Elektrophoresesystem wurde in einen isolierten Raum mit Sicherheitsverriegelungen eingeschlossen, um elektrische Schläge zu verhindern. Die Daten wurden in einem Integrator (Hewlett-Packard, Modell 3390A, Palo Alto, CA) gesammelt. Die Proben wurden in die Kapillare

gefüllt, indem 2-3 Sekunden lang ein Vakuum von 170 mb an den kathodischen Elektrodenbehälter angelegt wurde, während das anodische Kapillarenende in die Probenlösung getaucht wurde. Nachdem die Probe in die Kapillare gefüllt worden war, wurde das anodische Ende der Kapillare zusammen mit der anodischen Elektrode zurück in den Elektrophoresepuffer gebracht, und dann wurde die elektrophoretische Spannung angelegt. Die Temperatur der die Kapillare umgebenden aufgerührten Luft wurde für alle Experimente bei $30,0^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ gehalten. Eine Beschreibung der Verfahren zur Berechnung der elektrophoretischen Mobilität wird an anderer Stelle gegeben [18].

15 B. Viskositätsmessungen

Viskositätsmessungen wurden mit einem Ostwald-Viskosimeter [19] durchgeführt, das in einem Wasserbad auf $30^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ gehalten wurde.

20

Die bei dieser Studie verwendete DNA-Mischung war eine handelsüblich hergestellte Restriktionsaufbereitung des ϕX174 -Plasmids (Bethesda Research Labs, MD). Der bei allen Experimenten verwendete Puffer bestand aus 89 mM tris[Hydroxymethyl]aminomethan, 89 mM Borsäure und 5 mM Ethylendiamintetraacetylsäure (TBE) mit variierenden Mengen zugegebener (Hydroxyethyl-)Cellulose (HEC).

25

Beispiel 2

30 Verwicklungsschwelle und Porengröße von HEC-Lösungen

A. Verwicklungskonzentration

Experimentell kann der Punkt, an dem eine Polymerlösung verwickelt wird, durch Auftragen des Logarithmus für die spezifische Viskosität, η_{sp} , als Funktion der Polymer volumenfraction bestimmt werden [20]. Für unabhängige, nicht-interagierende Moleküle, d.h. $\phi < \phi^*$, sagen Theorien über dünnflüssige Lösungen voraus, daß die Steigung einer solche Kurve ungefähr 1,0 betragen sollte [21]. Wenn dann die Polymerspulen zu interagieren beginnen, wird erwartet, daß die Steigung ansteigt. Als Beispiel für dieses Verhalten werden in Fig. 6 experimentelle Ergebnisse für Lösungen aus in einem tris-Bor-Elektrophoresepuffer aufgelöster Hydroxyethylcellulose (HEC) vorgestellt. Die durchgehende Linie in Fig. 6 ist die Anpassung der kleinsten Quadrate an die ersten vier Punkte, wobei die Steigung 1,07 beträgt. Diese Daten implizieren, daß für dieses System $0,29\% < \phi^*_{HEC} < 0,4\%$ ist. Es ist bezeichnend, daß der absolute Wert der Viskosität dieser HEC-Lösung an der Verwicklungsschwelle sehr niedrig ist - im Bereich von 1 mPa·s. Dies ist eines der auffallendsten Merkmale dieser Systeme: daß man eine Netzstruktur in Lösungen mit der Viskosität von Wasser erzeugen kann.

Um die Übereinstimmung zwischen dem in Fig. 6 experimentell bestimmten Wert für ϕ^* und dem durch Gleichung (1) vorausgesagten Wert zu prüfen, müssen wir zunächst einen ungefähren Wert für N für das HEC bestimmen. Dies kann mit der Mark-Houwink-Sakurada-Gleichung [22] erfolgen:

$$[\eta] = K * (MW)^{amHS} \quad (10)$$

wobei $[\eta]$ die intrinsische Viskosität, MW das Molekulargewicht des Polymers ist und K und amHS Konstanten

sind, die für ein bestimmtes Polymer/Lösungsmittel-System bei einer bestimmten Temperatur kennzeichnend sind. Für in Wasser aufgelöstes HEC ist $K = 9,533 \cdot 10^{-3}$ ml/g und $a_{MHS} = 0,87$ [22]. Aus Viskositätsmessungen
 5 (Daten nicht abgebildet), dem Wert für $[\eta]$ und den Parametern K und a_{MHS} kann man einen ungefähren Wert für das Molekulargewicht des Polymers bestimmen. Der resultierende Wert für das Molekulargewicht von HEC ist 191.800. Daher ist der Wert für $N = 1026$, nimmt man ein
 10 Molekulargewicht des Monomers von 187 für HEC an. Mit diesem Wert für N sagt Gleichung (1) voraus, daß $\phi^*_{HEC} = 0,39\%$, was mit dem experimentellen Wert von $0,29 < \phi^*_{HEC} = 0,40$ übereinstimmt.

15 B. Porengröße

Um Gleichung (2) auf die Berechnung einer Porengröße anzuwenden, muß man zunächst einen Wert für die statistische Segmentlänge a für HEC abschätzen. Der Wert für
 20 a kann aus intrinsischen Viskositätsmessungen abgeschätzt werden. Nach Flory [23] gilt für ein Polymer mit zufällig verteilten Spulen:

$$25 \quad [\eta] = \frac{\phi_c \langle r^2 \rangle^{\frac{1}{2}}}{M^{\frac{1}{2}}} \quad (11)$$

wobei ϕ_c eine Universalkonstante mit einem Wert von $2,1 \cdot 10^{23}$ ist, wenn $[\eta]$ die Einheiten ml/g hat und $\langle r^2 \rangle$ der durchschnittliche Quadratwurzelabstand von einem Ende
 30 der Polymerkette zum entgegengesetzten ist. Außerdem gilt für eine unbeeinflusste Kette:

$$(R_g^2) = \frac{\langle r^2 \rangle}{6} \quad (12)$$

Auf der Basis eines gemessenen Wertes von 317 ml/g für $[\eta]$ im Elektrophoresepuffer (Daten nicht abgebildet), ergeben die Gleichungen (11) und (12) einen Wert von 270 Å für R_v . Als nächstes gilt angesichts der Beziehung
5 zwischen der Segmentlänge a und R_v für eine unbeeinflusste Spule:

$$R_v = aN^{0,6} \quad (13)$$

10 und da $N = 1026$, ist also $a = 4,21$ Å. Dies liegt in der Nähe der veröffentlichten Segmentlänge von 4,25 Å für HEC [22]. Dieser Wert für a wird derzeit in diesem Labor durch dynamische Streulichtmessungen bestätigt.

15 Mit diesem Wert für a ist es interessant, die ungefähren Porengrößen der Polymerlösungen mit denen traditioneller Elektrophoresegele zu vergleichen. Righetti [24] hat eine empirische Beziehung entwickelt, um die Porengröße in Agarosegelen mit der Agarosekonzentration in
20 Beziehung zu setzen:

$$\xi = 1407 C^{-0,7} \quad (14)$$

25 wobei ξ die gemessene Porengröße (in Å) und C die Konzentration der Agarose (in Gew.-%) ist. Dieser empirische Ausdruck hat dieselbe Form und einen ähnlichen Exponentenwert wie die von der Verwicklungstheorie vorausgesagten. Vergleicht man jedoch die Ergebnisse der Gleichungen (2) und (14), scheint die verwickelte Lösung
30 bei einer bestimmten Gewichtsfraktion von Polymer eine kleinere Porengröße zu erzeugen. Dies paßt zu der Tatsache, daß in einem Agarosegel die Polymerfasern als Bündel existieren und somit größere Freiräume lassen.

In Fig. 7 werden die mit den Gleichungen (2) und (14) vorausgesagten Porengrößen verglichen. Auf der Basis dieser Gleichungen scheint es also, daß die unter Verwendung von verwickelten Polymeren erreichbaren Porengrößen eine Größenordnung kleiner sind als jene unter Verwendung von Agarosegelen mit derselben Polymerkonzentration.

Beispiel 3

10 DNA-Fragmentseparation in HEC-Polymerlösungen

Fig. 8 zeigt ein repräsentatives Elektropherogramm von DNA-Fragmenten, deren Größe zwischen 72 und 1353 Basenpaaren liegt. Eine Beschreibung des in diesen Studien
15 verwendeten Kapillarelektrophoresegeräts sowie der zur Berechnung der elektrophoretischen Mobilität verwendeten Verfahren wird an anderer Stelle gegeben [18].

Wie zuvor erwähnt, sollte nach dem Ogston-Modell ein
20 Auftragen des Logarithmus μ gegen %HEC (ein Ferguson-Plot) eine lineare Beziehung mit einer Steigung gleich K_r und einem Schnittpunkt mit der Y-Achse gleich $\log \mu_0$ ergeben. Für die Fragmente 118, 194, 234, 281 und 310 in Lösungen bis zu $\phi^* \text{HEC} = 0,4\%$ wird dieses Verhalten
25 auch tatsächlich beobachtet (Fig. 9). Der Schnittpunkt dieser fünf Linien, 0,588 (%RSD = 0,15%) impliziert für μ_0 einen Wert von $3,87 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V s}$ (%RSD = 1,2%, $n = 16$). Dies ist ein interessantes Ergebnis. Zuvor konnte in Systemen mit starren Gelen der Wert für μ_0 nur auf
30 der Basis des Schnittpunkts mit der Y-Achse des Ferguson-Plots gefolgert werden. Hier kann der Wert für μ_0 auf der Basis des Schnittpunkts mit der Y-Achse mit dem tatsächlich gemessenen Wert verglichen werden, da μ_0 direkt gemessen werden kann. Die enge Übereinstimmung

dieser beiden Werte für μ_0 ist eine zwingende Verifizierung des Ogston-Mechanismus. Für Fragmente, die größer als 310 Basenpaare sind, nimmt die Übereinstimmung ab. Dies geschieht wahrscheinlich aufgrund des schrittweisen Übergangs zu den Reptationsbedingungen für diese größeren Fragmente. Dieser Übergang wurde ebenfalls bei Agarosegelen beobachtet [14].

Nach dem Ogston-Modell sollte sich beim Auftragen von $K_r^{0,5}$ gegen R_g eine lineare Beziehung ergeben, angenommen $R_g \gg r$. Wie in Fig. 10 zu sehen ist, besteht eine enge Übereinstimmung mit der Voraussage des Ogston-Modells für die kleineren Fragmente, während die größeren Fragmente signifikant abweichen. $\langle R_g^2 \rangle^{1/2}$ wird für eine DNA nach dem Porod-Kratky-Starrkettenmodell unter Annahme einer Persistenzlänge von 450 Å und einer Konturenlänge von 3,4 Å pro Basenpaar berechnet [25]. Nach Slater und Noolandi [26, 27] findet, basierend auf Experimenten und numerischen Simulationen, der Übergang von den Ogston- zu den Reptationsbedingungen statt, wenn $R_g \approx 1,4 \xi$. Da gemäß Fig. 10 der Übergang auftritt, wenn $312 \text{ Å} < R_g < 490 \text{ Å}$ und $\phi *_{\text{HEC}} = 0,4\%$, impliziert also Fig. 10, wenn $\phi *_{\text{HEC}} = 0,4\%$ ist, ist $223 \text{ Å} < \xi < 350 \text{ Å}$. Dies stimmt mit der durch Gleichung (2) vorausgesagten Porengröße von 264 Å überein. Fig. 10 liefert also eine unabhängige Bestätigung der Gleichung (2).

In Fig. 11 ist $\log \mu$ als eine Funktion von $\frac{1}{N_{\text{DNA}}}$ aufgetragen. Nach Gleichung (8) sollten diese Kurven linear mit Steigungen von 1,0 sein, wenn die Fragmente nach dem Reptationsmechanismus wandern. Wie aus der vorangehenden Analyse für die in diesen Experimenten verwendeten Bedingungen erwartet, hält keine der Kurven das Reptationsverhalten ein. Wenn jedoch die HEC-Konzen-

tration erhöht wird, scheinen die Steigungen der Kurven gegen 1 zu gehen. Auch dieses Verhalten wurde für Agarsegele mit geringer Konzentration unter Verwendung kleiner DNA-Fragmente beobachtet [14].

5

Wahrscheinlich nimmt die Separationsleistung dieser Systeme schnell ab, sobald $R_g \gg \xi$ ist, d.h. wenn die Reptation stark wird. Dies geschieht, weil bei den starken elektrischen Feldern, die üblicherweise bei der
10 Kapillar-Elektrophorese verwendet werden, der Wert des Ausdrucks bE in Gleichung (9) groß ist, was zu einer gesättigten, größenunabhängigen Mobilität führt. Obwohl diese Beschränkung nicht einzigartig für das Polymerlösungssystem ist, stellt sie doch eine Beschränkung für
15 die Fähigkeit dar, die starken elektrischen Felder für die sich daraus ergebende schnelle Analyse mit CE auszunutzen.

Obwohl die Erfindung unter Bezugnahme auf bestimmte
20 Polymerlösungen und Anwendungen beschrieben wurde, können verschiedene Änderungen und Modifikationen innerhalb des Geltungsbereichs der Erfindung vorgenommen werden.

25

30

Patentansprüche

1. Ein Kapillarelektrophorese-Element, aufweisend ein
Kapillarelektrophoreseröhrchen, und
5
in dem Röhrchen eine Lösung aus einem ungeladenen,
wasserlöslichen Polymer, gekennzeichnet durch:
- (a) eine Polymermassenkonzentration C , die zwi-
schen ca. $1/[\eta]$ und $5/[\eta]$ liegt, wobei $[\eta]$ die in-
10 trinsische Viskosität des Polymers ist;
- (b) eine tatsächliche Lösungsviskosität von unter
ca. 100 mPa·s; sowie
15
- (c) eine Polymer-Porengröße ξ , die ungefähr gleich
 $aC^{-0,75}$ ist, wobei a die Persistenzlänge des Polymers
ist.
- 20 2. Ein Element nach Anspruch 1, worin die Porengröße ξ
zwischen 50 und 100 Å und die Massenkonzentration
des Polymers zwischen 3 und 6 Gew.-% liegt und die
Polymerlösung eine Viskosität zwischen 5 und 50
25 mPa·s hat.
3. Ein Element nach Anspruch 1 oder 2, worin die Po-
rengröße ξ zwischen 200 und 300 Å und die Massenkonzentration
des Polymers zwischen 0,2 und 0,6 Gew.-%
30 liegt und die Polymerlösung eine Viskosität zwi-
schen 1 und 10 mPa·s hat.
4. Ein Kapillarelektrophorese-Element nach einem der
vorangehenden Ansprüche, worin das wasserlösliche

Polymer ein Polyether, Polyethylenimin, Polyacrylsäure, Polycrylamid, Polymethacrylamid, Polymethacrylsäure, Polyvinylacetat, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylloxazolidon, wasserlösliches Hydroxylpolymer, oder eine wasserlösliche Zelluloseverbindung, oder ein Copolymer oder eine Mischung von diesen aufweist.

5. Ein Verfahren zur Herstellung eines Polymerelements zur Verwendung bei der elektrophoretischen Separation durch Kapillarelektrophorese einer Mischung von Biopolymermolekülen innerhalb eines ausgewählten Größenbereichs, aufweisend

Auswählen einer Polymer-Porengröße ξ , die für die Separation der Biopolymermischung in einem elektrischen Feld geeignet ist,

Auswählen eines ungeladenen, wasserlöslichen Polymers mit einer intrinsischen Viskosität $[\eta]$ und einer Persistenzlänge a , so daß die ausgewählte Porengröße ungefähr gleich $aC^{-0.75}$ ist, wobei C zwischen ca. $1/[\eta]$ und $5/[\eta]$ liegt und die tatsächliche Viskosität unter ca. 100 mPa·s liegt,

Bilden einer Lösung des Polymers bei einer Konzentration C zwischen ca. $1/[\eta]$ und $5/[\eta]$, sowie

Ziehen der Polymerlösung in ein Kapillarelektrophoreseröhrchen.

6. Ein Verfahren nach Anspruch 5, worin die Porengröße ξ zwischen 50 und 100 Å und die Massenkonzentration

des Polymers zwischen 3 und 6 Gew.-% liegt und die Polymerlösung eine Viskosität zwischen 5 und 50 mPa·s hat.

- 5 7. Ein Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, worin die Porengröße ξ zwischen 200 und 300 Å und die Massenkonzentration des Polymers zwischen 0,2 und 0,6 Gew.-% liegt und die Polymerlösung eine Viskosität zwischen 1 und 10 mPa·s hat.
- 10
8. Ein Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, worin das wasserlösliche Polymer ein Polyether, Polyethylenimin, Polyacrylsäure, Polycrylamid, Polymethacrylamid, Polymethacrylsäure, Polyvinylacetat, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylloxazolidon, wasserlösliches Hydroxylpolymer, oder eine wasserlösliche Zelluloseverbindung, oder ein Copolymer oder eine Mischung von diesen aufweist.
- 15
- 20
- 25
- 30

Fig. 1A

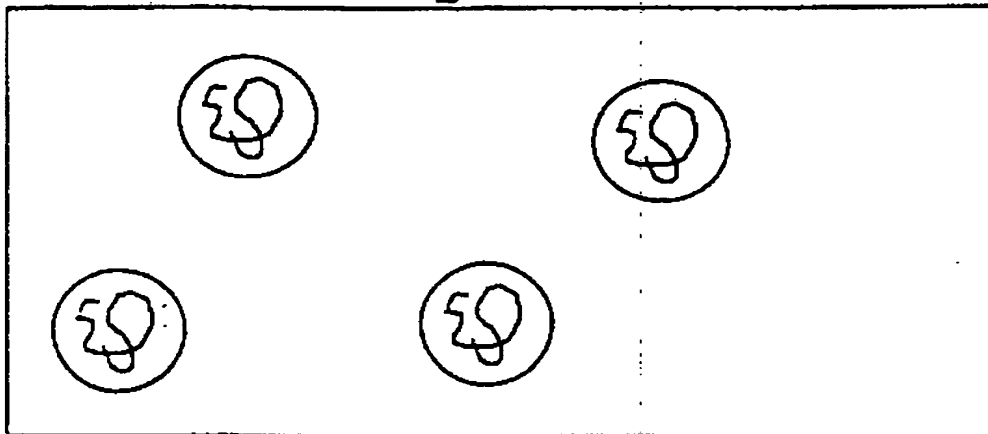


Fig. 1B

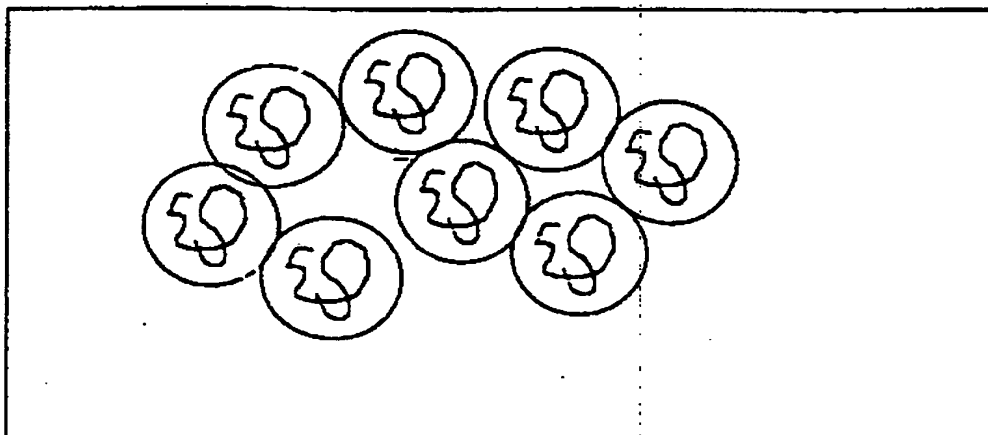
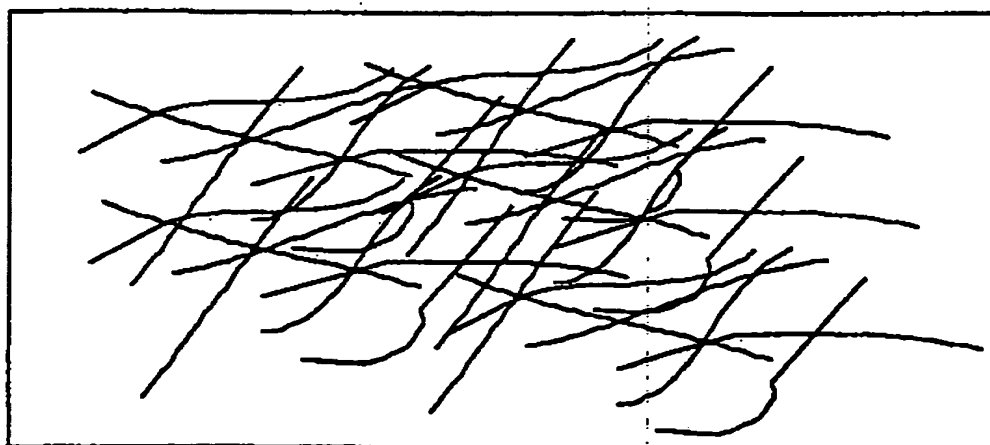


Fig. 1C



21.08.97
2/6

0 523 982

Fig. 2

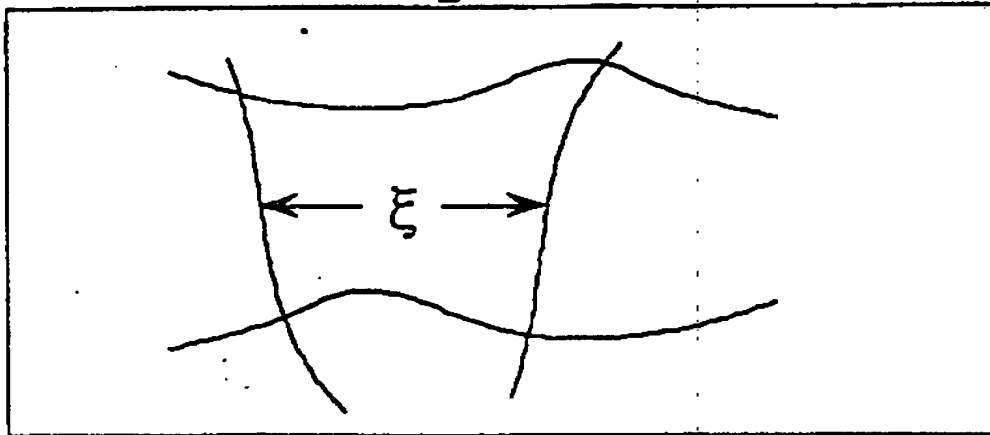


Fig. 3

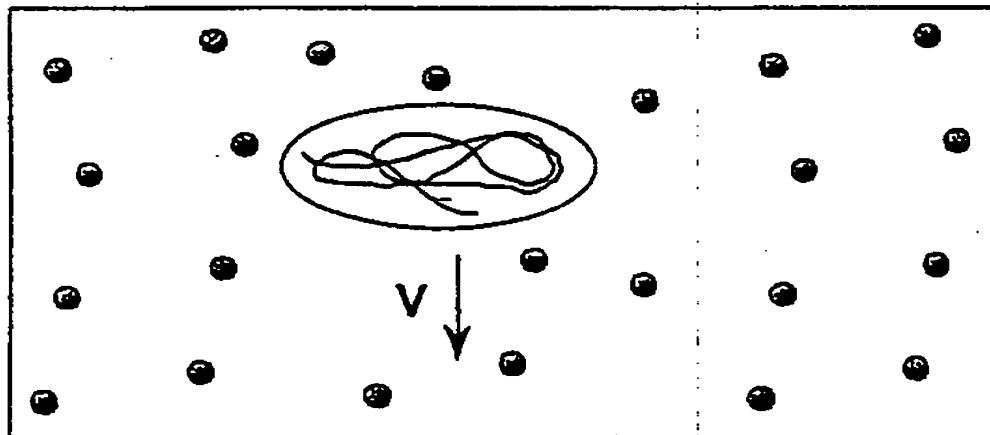
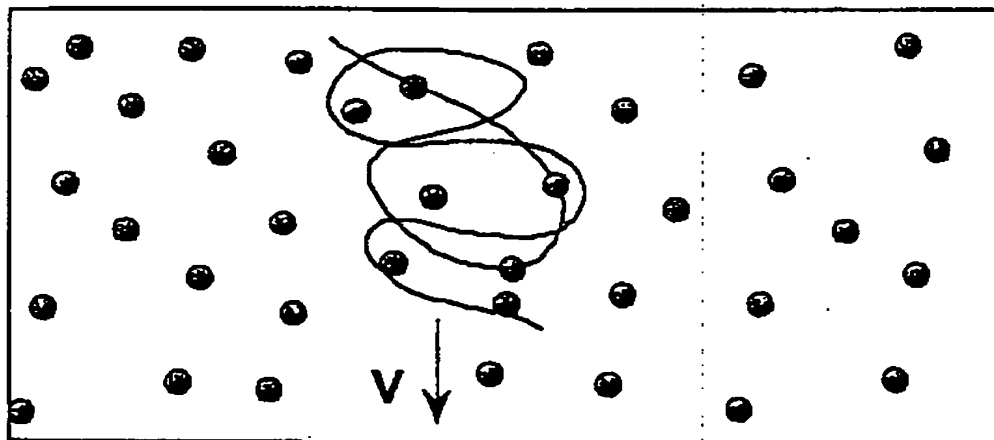
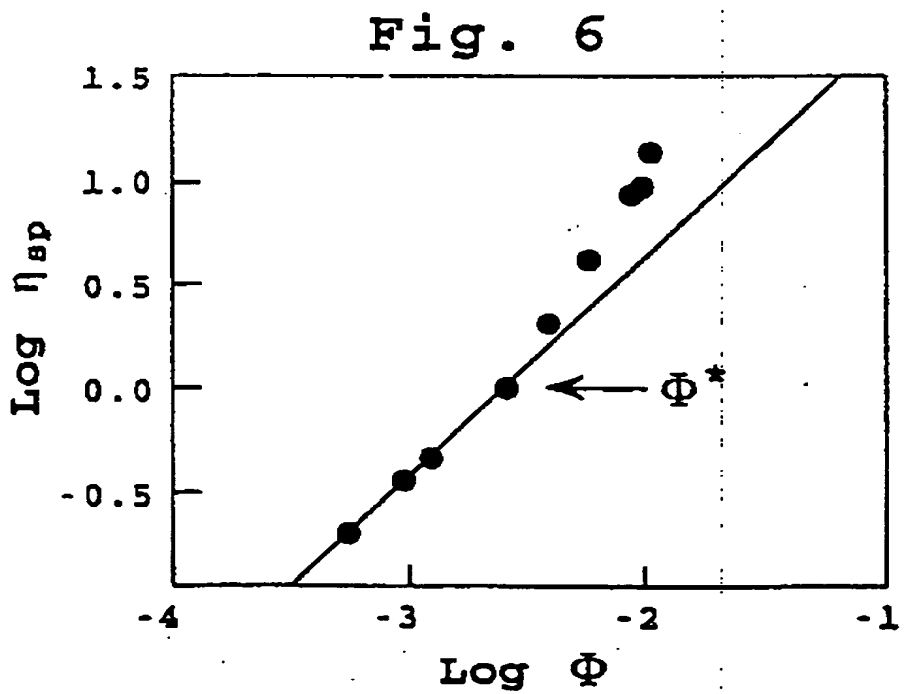
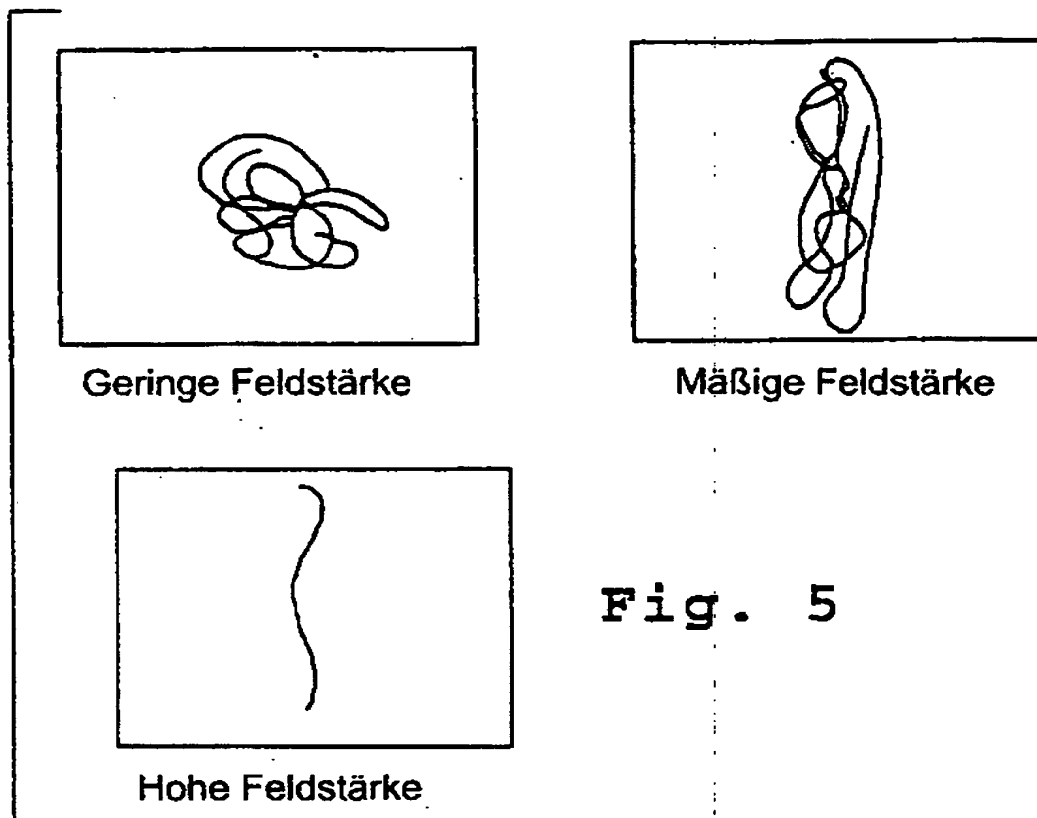


Fig. 4





21.08.97
4/6

0 523 982

Fig. 7

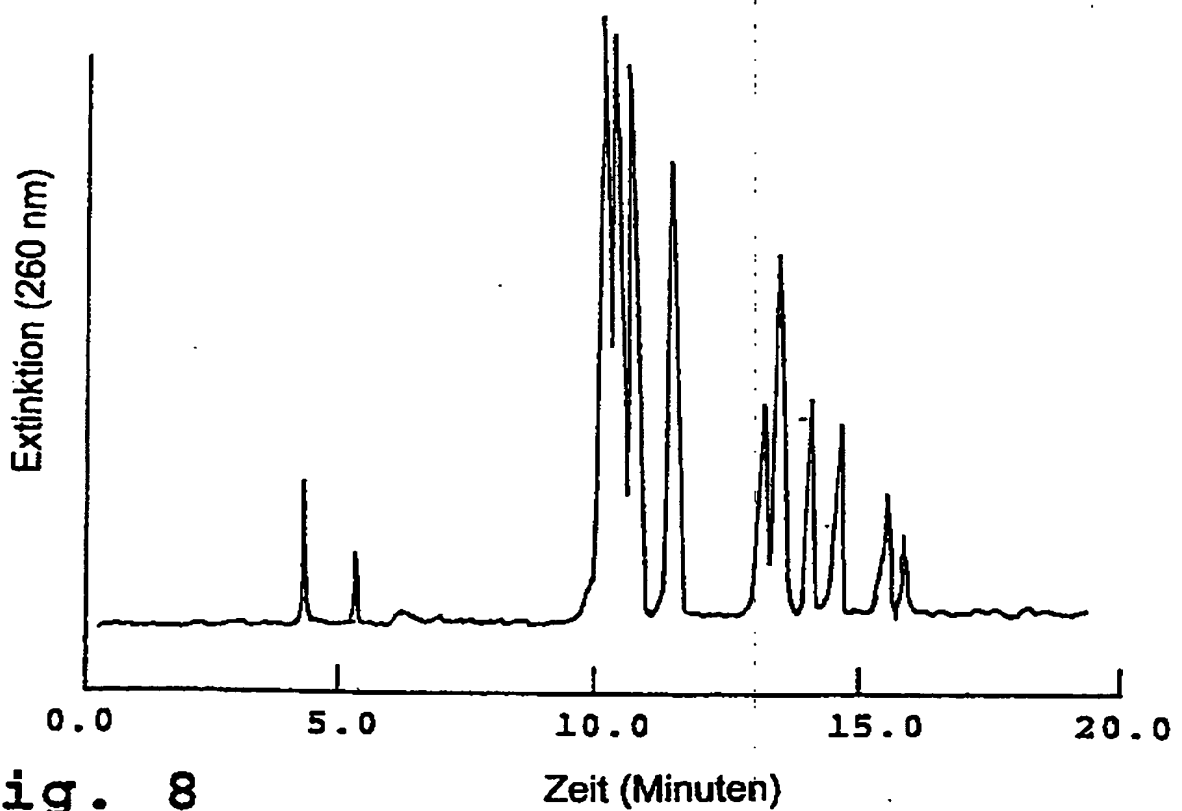
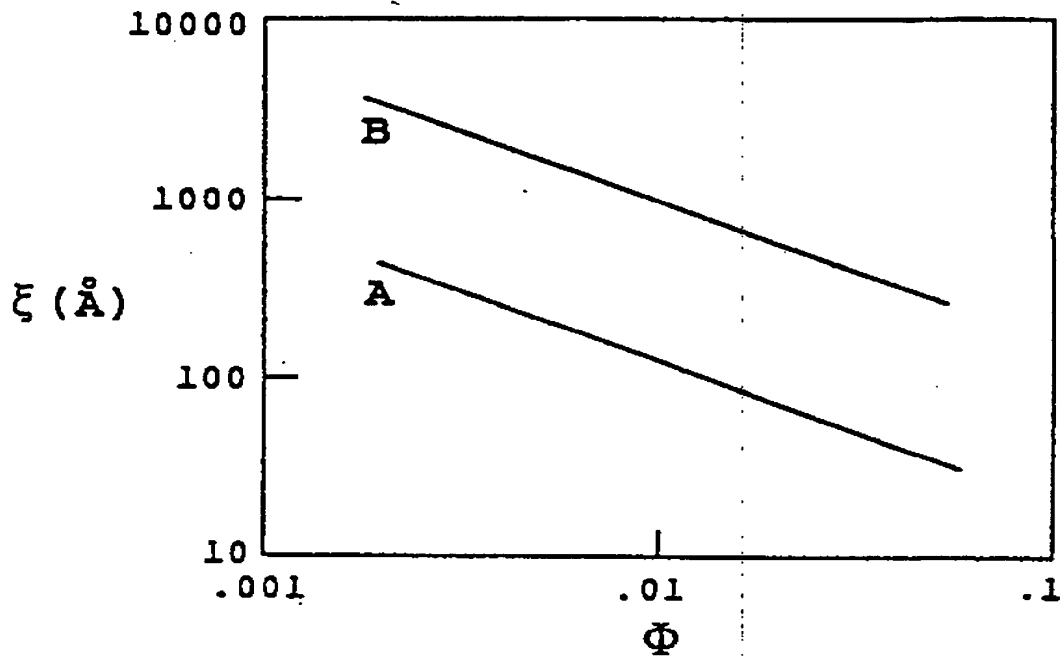


Fig. 8

21.08.97

5/6

0 523 982

Fig. 9

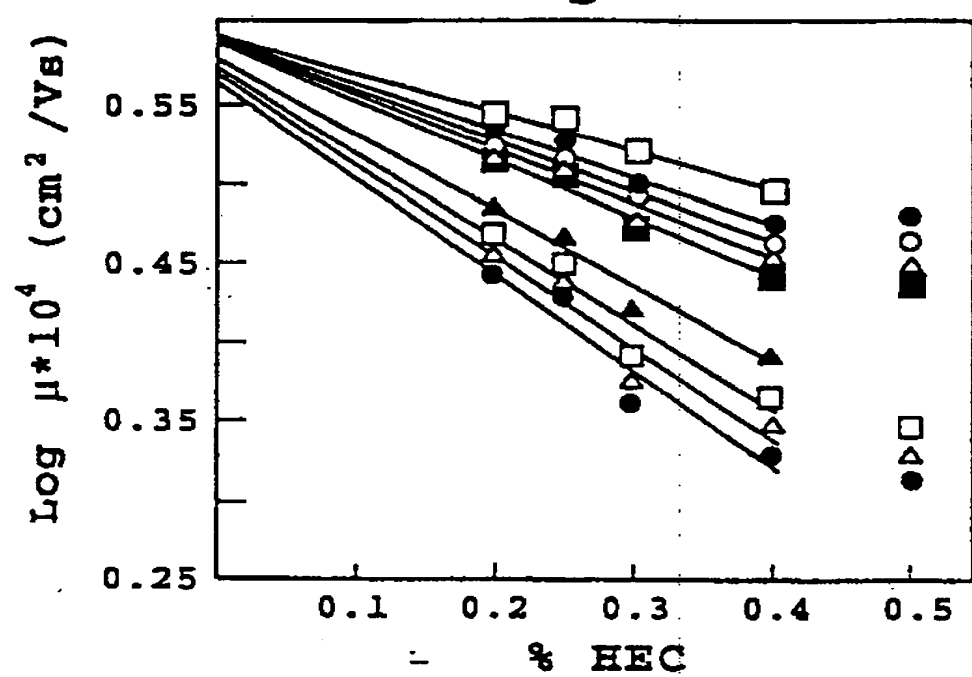
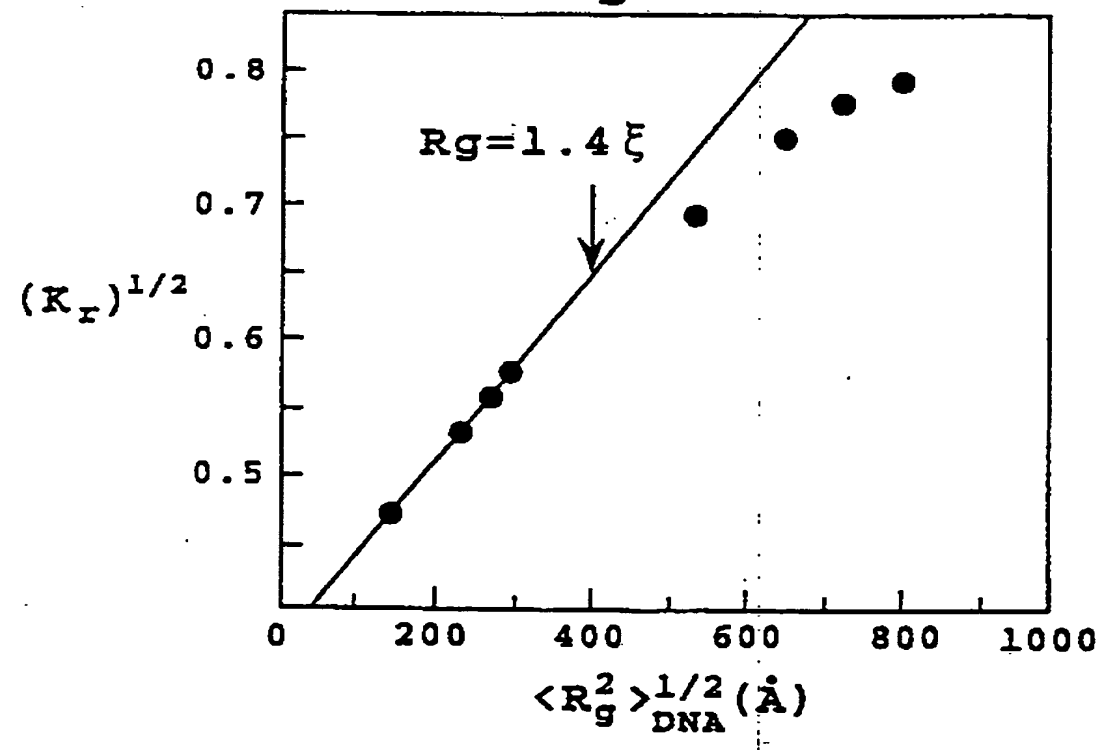


Fig. 10

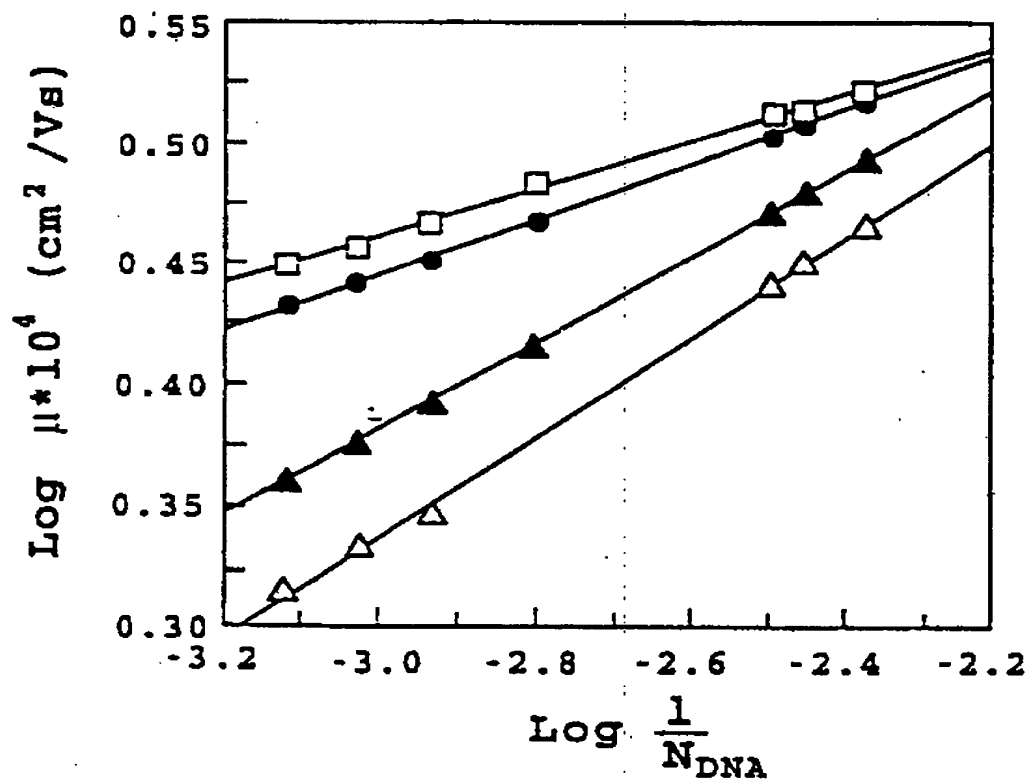


21.08.97

6/6.

0 523 982

Fig. 11



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.